

Veränderungen von Milchproteinen durch Einwirkung von Carbonylverbindungen

III. Mitteilung

Neutrale Monocarbonylverbindungen in gelagerter, sprühgetrockneter Vollmilch*

J. SCHORMÜLLER, M. WALTHER und W. WACHS

Mitteilung aus dem Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität Berlin**

Eingegangen am 14. Juni 1968

Trockenvollmilch ist ein kompliziert zusammengesetztes Lebensmittel, das während der Herstellung und Lagerung mannigfaltige Veränderungen physikalischer und chemischer Natur erleiden kann. Die komplexen chemischen Vorgänge sind fast immer mit einer Minderung des ernährungsphysiologischen Wertes des Produktes verbunden und geben sich häufig im Auftreten unerwünschter Geruchs- und Geschmacksabwandlungen zu erkennen. Untersuchungen über die Verbindungen, die zu einem Geruchs- und Geschmacksfehler beitragen, haben zu der Erkenntnis geführt, daß dabei den Carbonylverbindungen mit ihren intensiven sinnesphysiologischen Eigenschaften eine entscheidende Bedeutung beizumessen ist (1, 2). Welche Bedeutung den Carbonylverbindungen dadurch zukommt, daß sie mit reaktionsfähigen Gruppen anderer Milchpulverkomponenten in Wechselwirkung treten, ist hingegen noch ungeklärt. Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Veränderungen an Membranproteinen bei der Lagerung (3, 4) sollte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, welche Carbonylverbindungen den Milchproteinen als Reaktionspartner zur Verfügung stehen und in welcher Konzentration einzelne Vertreter im Vollmilchpulver, speziell in dem von einer Membran umgebenen MilCHFett, vorliegen. Wir beschränkten uns dabei auf die Analyse der neutralen Monocarbonylverbindungen.

Experimentelles

1. Untersuchtetes Material und Reagentien

Milchpulver. Es wurde ein sprühgetrocknetes Vollmilchpulver untersucht¹. Probe A wurde in verschlossenen Dosen unter Stickstoff 8 Monate bei 0° C gehalten;

Probe B wurde 3 Monate in verschlossenen Dosen unter Stickstoff bei 0° C und weitere 3 Monate in großen Petrischalen im Klimaschrank bei 27° C und 30% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert.

* Auszug aus der Promotionsarbeit von M. WALTHER: Beitrag zur Analyse der neutralen Monocarbonylverbindungen in Vollmilchpulvern. Diss. Techn. Univ. Berlin 1967 (D 83).

** Diese Untersuchungen wurden teilweise durch eine Beihilfe des United States Department of Agriculture unter P.L. 480 finanziert. Für die großzügige Unterstützung danken wir verbindlich.

¹ Für die Bereitstellung des Vollmilchpulvers, hergestellt nach U.S.P. 3.065.076, sind wir der AFICO AG, Lausanne/Schweiz, zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

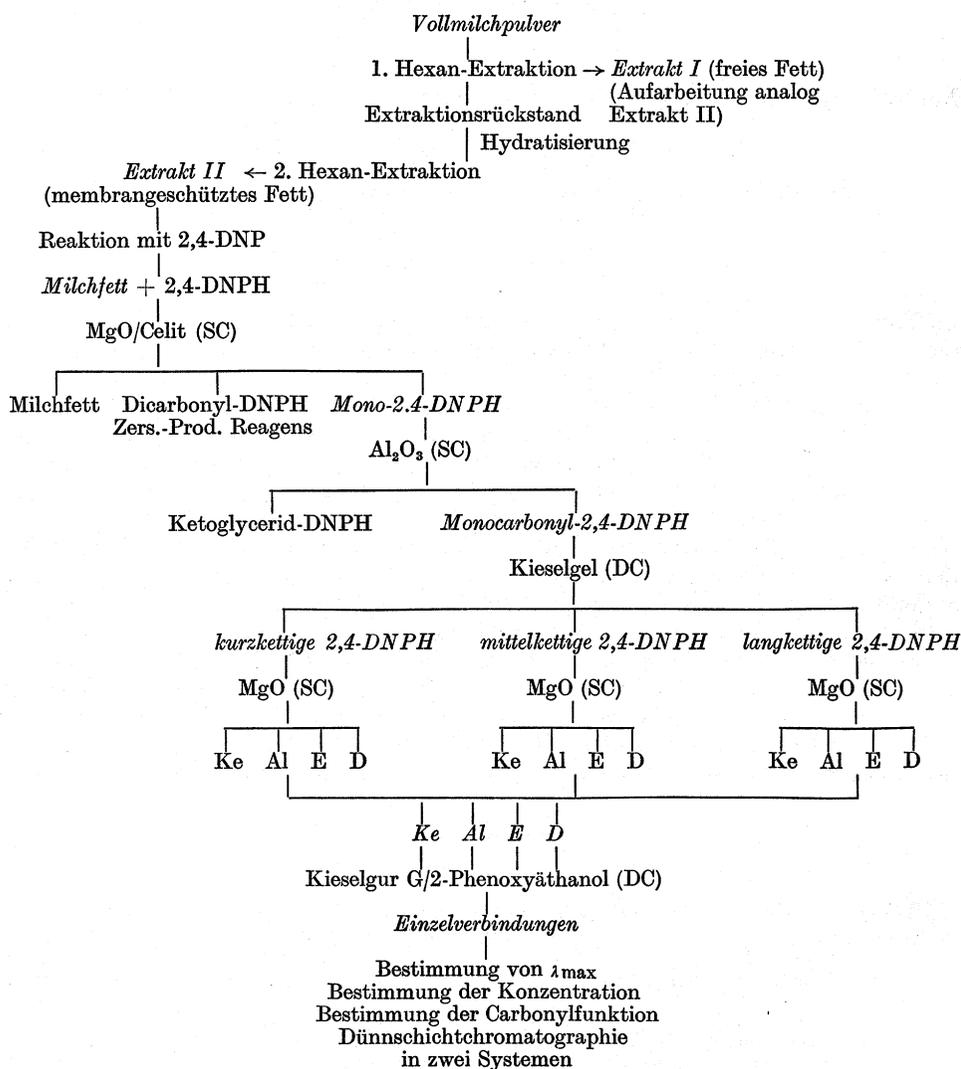
n-Hexan („für die Chromatographie“, Fa. Merck) wurde destilliert, durch eine mit konzentrierter Schwefelsäure imprägnierte Celit-Säule (5) und anschließend dreimal durch eine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNP) und Phosphorsäure imprägnierte Celit-Säule (6) filtriert und über eine Kolonne fraktioniert.

Celit 545 (Fa. Roth) wurde 24 Std bei 150° C getrocknet.

Magnesiumoxid („Seasorb 43“, Fisher Scientific Co., Zürich) wurde 24 Std bei 400° C getrocknet.

2. Versuchsführung zur Analyse der Carbonylverbindungen

Die angewendete Technik zur Isolierung, Trennung, Identifizierung und quantitativen Bestimmung der neutralen Monocarbonylverbindungen der Vollmilchpulver A und B ist in Abb. 1 skizziert.



a) Extraktion

α) Vorversuche: Zu 20 g Vollmilchpulver in einem 200 ml-Erlenmeyerkolben wurden 50 ml Hexan gegeben und unter intensivem Rühren (Magnetrührer) aus einer Mikrobürette tropfenweise 0,5 ml Wasser (= 2,5% der Trockenmilcheinwaage) hinzugefügt. Die Mischung wurde über Nacht stehen gelassen, dann durch eine Glasfritte filtriert und der Extraktionsrückstand mit 25 ml Hexan gewaschen. Dieser wurde erneut 30 min in 50 ml Hexan gerührt, danach abfiltriert und mit 25 ml Hexan gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Der Fettgehalt wurde gravimetrisch bestimmt. Er wird in der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse (vgl. Abb. 2) in Prozent des Gesamtfettgehaltes des Milchpulvers angegeben. Dieser wurde nach WEIBULL-STOLDT [7; vgl. auch Zitat (8)] ermittelt und zu 25,5% des Pulvergewichtes gefunden. Der Versuch wurde unter Zugabe von 5 bzw. 7,5; 9; 10; 12,5 und 15% Wasser wiederholt (Doppelbestimmungen).

β) Zur Gewinnung der Carbonyl-Extrakte wurde wie folgt gearbeitet:

1. Stufe: In einem 1000 ml-Erlenmeyerkolben wurden 200 g Milchpulver in 400 ml carbonylfreiem Hexan suspendiert und in einer Stickstoffatmosphäre 30 min mechanisch gerührt (Flügelrührer). Anschließend wurde bei leichtem Unterdruck durch eine Glasfritte (17 G 3, Fa. Schott u. Gen.) filtriert und mit 150 ml carbonylfreiem Hexan gewaschen.

2. Stufe: Der Rückstand der 1. Hexan-Extraktion wurde in den Erlenmeyerkolben zurückgeführt und mit 400 ml carbonylfreiem Hexan versetzt. Unter mechanischem Rühren (Flügelrührer) in einer Stickstoffatmosphäre wurden aus einer Bürette tropfenweise 20 ml dest. Wasser hinzugefügt. Nach dem Stehen über Nacht wurde bei leichtem Unterdruck durch eine Glasfritte (s. o.) filtriert und der Rückstand zur Entfernung des noch adsorbierten Fettes erneut 30 min in 400 ml Hexan gerührt. Danach wurde filtriert und mit 100 ml Hexan gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

Die vereinigten Extrakte der 1. Stufe von fünf 200 g-Ansätzen werden im folgenden mit „Extrakt I“ bezeichnet, die der 2. Stufe mit „Extrakt II“.

b) Umsetzung mit 2,4-DNP

Die extrahierten Carbonylverbindungen wurden quantitativ in die 2,4-Dinitrophenylhydrazone (2,4-DNPH) übergeführt, indem die Extrakte durch „Reaktionssäulen“ filtriert wurden, die nach SCHWARTZ u. Mitarb. (6) mit 2,4-DNP und Phosphorsäure homogen imprägniertes Celit 545 enthielten. Zwei (für Extrakt I) bzw. vier (für Extrakt II) dieser Säulen wurden parallel eingesetzt.

c) Isolierung der Monocarbonyl-2,4-DNPH

Das Eluat der Reaktionssäule enthielt neben den 2,4-DNP-Derivaten der Monocarbonylverbindungen noch die in der Fett-Hexan-Lösung löslichen Mono- und Bis-2,4-DNPH anderer Verbindungsklassen, eine geringe Menge des 2,4-DNP und seiner Zeretzungsprodukte sowie das Milchfett. Unter Berücksichtigung der Angaben von SCHWARTZ u. Mitarb. (9) wurden die 2,4-DNPH an einer Säule von Seasorb (2 g + 3 g) (25 g Seasorb/Celit für Extrakt I, 60 g für Extrakt II) adsorbiert, das Milchfett mit Hexan ausgewaschen und die Mono-2,4-DNPH mit Nitromethan/Chloroform (1 + 3) eluiert. Reagens, Dicarbonyl-bis-2,4-DNPH und Zeretzungsprodukte der Ketoglyceride blieben auf der Säule zurück. Das Mono-2,4-DNPH-Gemisch wurde anschließend zur Abtrennung der Ketoglycerid-2,4-DNPH an Aluminiumoxid der Aktivität II—III (30 g für Extrakt I, 2 Säulen zu je 50 g für Extrakt II) fraktioniert (9). Die Monocarbonyl-2,4-DNPH wurden mit Benzol/Hexan (1 + 1) eluiert.

d) Trennung und Identifizierung der Monocarbonyl-2,4-DNPH

Die für eine quantitative Trennung und sichere Identifizierung der Einzelverbindungen erforderliche Auftrennung in Verbindungsklassen war bei dem vorliegenden komplexen Monocarbonyl-2,4-DNPH-Gemisch insofern erschwert, als das als Anfangsglied einer homologen Reihe sich anomal verhaltende Aceton-2,4-DNPH und einige 2,4-DNPH geringer Polarität in vergleichsweise hoher Konzentration auftraten. Daher wurde zunächst eine Vortrennung durchgeführt, indem das 2,4-DNPH-Gemisch, gelöst in wenig Chloroform, auf Kieselgel G-Schichten von 0,5 mm Dicke als Punktreihe längs der Startlinie aufgetragen, das Chromatogramm nach dreimaligem Entwickeln mit Benzol/Hexan (3 + 2) parallel zur Startlinie in drei Zonen unterteilt und die Kieselgel-Schicht jeder Zone mit einem Spatel sorgfältig von der Platte abgeschabt und in Extraktionshülsen gesammelt wurde. Die untere Zone erfaßte die Hydrazone hoher Polarität (einschließlich Aceton-2,4-DNPH), die mittlere Zone die 2,4-DNPH mit mittlerer Kettenlänge (bis einschließlich Dodecanal) und die dritte Zone alle restlichen 2,4-DNPH bis zur Front.

Zur Orientierung dienten zwei jeweils mitchromatographierte Modellgemische der Alkanal- und Alkan-2-on-2,4-DNPH.

Jede der drei Fraktionen wurde in Anlehnung an eine Arbeitsmethode von SCHWARTZ u. Mitarb. (10) säulenchromatographisch in Verbindungsklassen, nämlich in Alkanone, Alkanale, Alk-2-enele und Alk-2,4-dienale aufgetrennt. Wir verwendeten Seasorb 43/Celit (1 g + 2 g) und entwickelten mit Chloroform und Methanol-Chloroform-Mischungen mit einem Methanol-Anteil von 1, 2, 4 und 10%. Um die Vollständigkeit der Chromatographie zu prüfen wurde abschließend jeweils mit Nitromethan/Chloroform (1 g + 3 g) eluiert.

Die durch Adsorptionschromatographie gewonnenen Verbindungsklassen wurden verteilungs-chromatographisch nach dem Dünnschichtverfahren in die homologen Verbindungen aufgetrennt. Als stationäre Phase diente nach URBACH (11) 2-Phenoxyäthanol, an Kieselgur G fixiert. Petrolbenzin 100° bis 140° C wurde als mobile Phase verwendet. Die im Chromatogramm als gelbe Streifen erscheinenden Einzelverbindungen wurden sorgfältig von der Platte abgeschabt und mit Chloroform aus dem Kieselgur extrahiert. Zur Gewinnung der reinen Verbindungen wurden die 2,4-DNPH an Seasorb/Celit (1 g + 1 g) adsorbiert und das 2-Phenoxyäthanol mit Chloroform [im Falle von langkettigen Alkanon-2,4-DNPH wegen des geringeren Adsorptionsvermögens Chloroform/Hexan (1 + 1)] ausgewaschen. Die Eluation der 2,4-DNPH erfolgte mit Nitromethan/Chloroform (1 + 3).

Von jeder isolierten Verbindung wurde das Absorptionsspektrum in neutraler Lösung (Chloroform) zwischen 330 und 400 nm mit dem Spektralphotometer (PMQ II, Fa. Zeiss) aufgenommen. Die Konzentration der Carbonylverbindung wurde aus der angezeigten Extinktion bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums berechnet. Der Berechnung wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten zugrunde gelegt:

$2,22 \times 10^4$ (für Alkan-2-one), $2,20 \times 10^4$ (für Alkanale), $2,90 \times 10^4$ l/mol · cm (für Alk-2-enele).

Zur Identifizierung wurden die gereinigten und spektrophotometrisch analysierten 2,4-DNPH dünn-schichtchromatographisch mit Modellverbindungen verglichen. Hierfür wurden zwei verteilungschromatographische Systeme herangezogen:

a) 2-Phenoxyäthanol, fixiert an Kieselgur G/Petrolbenzin 100°—140° C (11) und b) Carbowax 400, fixiert an Kieselgur G/Cyclohexan (12). RADINGS und WASSINK (12) geben Petrolbenzin 100°—120° C als Fließmittel an.

Die Test-2,4-DNPH wurden durch Umsetzen einer alkoholischen Lösung der käuflichen Carbonylverbindung mit perchlorsaurer wäßriger 2,4-DNP-Lösung hergestellt. Einige aliphatische Monocarbonylverbindungen standen bereits in Form ihrer 2,4-DNPH zur Verfügung¹.

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten 2,4-DNPH wurde nach SAWICKI u. Mitarb. (13) durch Umhydrazonisieren mit 3-Methylbenzthiazolon-(2)-hydrazon auf das Vorliegen einer Aldehyd- oder Ketongruppierung geprüft. In Anbetracht der geringen Konzentration einiger isolierter Verbindungen wurden nur sorgfältig gereinigte Reagentien (13) verwendet und parallel zur Analysensubstanz jeweils Modellverbindungen vergleichbarer Konzentration getestet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Anwendung einer Extraktionstechnik zur Isolierung der Carbonylverbindungen erschien uns in mehrfacher Hinsicht besonders aussichtsreich:

1. Bei entsprechender Versuchsführung ist die Möglichkeit gegeben, die Carbonylverbindungen, die im Vollmilchpulver a) außerhalb und b) innerhalb der von einer Membran umgebenen Fettkügelchen vorkommen, getrennt zu isolieren.

2. Die Isolierung erfolgt unter sehr milden Bedingungen. Die Raumtemperatur wird nicht überschritten, Destillationen entfallen ganz. Die Gefahr des Verlustes von Carbonylverbindungen einerseits und die der Neubildung (z. B. durch Hydroperoxid oder β -Ketosäure-Zersetzung) andererseits ist daher sehr gering.

3. Die extrahierten Carbonylverbindungen können an einer „Reaktionssäule“ direkt quantitativ in die entsprechenden 2,4-DNPH übergeführt werden. Es entfallen somit die Schwierigkeiten der quantitativen Derivatbildung in wäßrigen Systemen (14). Gegebenenfalls vorliegende Hydroperoxide werden hierbei nicht

¹ Herrn Dr. W. GROSCH, Berlin, und Herrn Dr. D. P. SCHWARTZ, Washington, USA, danken wir für die Überlassung von Modellsubstanzen.

zu Monocarbonylverbindungen zersetzt (9). Es muß jedoch damit gerechnet werden, daß an der Reaktionssäule die in den Milchlipoiden vorkommenden Plasmalogene sauer hydrolysiert werden und somit langkettige Aldehyde freigesetzt werden.

4. Es werden sowohl die flüchtigen als auch die schwer- und nichtflüchtigen Carbonylverbindungen erfaßt.

Die im experimentellen Teil beschriebene Extraktionsmethode zielt darauf ab, in der 1. Extraktionsstufe die Carbonylverbindungen, die sich außerhalb der Membran der Fettkügelchen befinden, zu isolieren, und in der 2. Stufe die Carbonylverbindungen des membrangeschützten Fettes zu erfassen. Sie geht davon aus, daß bei der Behandlung der Trockenvollmilch mit Hexan nur das „freie Fett“ extrahiert wird und das membrangeschützte Fett – wie bereits von LAMPITT und BUSHILL (15) bei der Lagerung von Sprühmilchpulver in wasserdampfgesättigter Atmosphäre beobachtet wurde – erst bei einem „kritischen Wassergehalt“ des Pulvers einer Extraktion durch Fettlösungsmittel zugänglich wird, wobei die Kristallisation der Lactose eine bedeutende Rolle spielt (16).

In Vorversuchen stellten wir zunächst fest, daß eine Hydratisierung des Vollmilchpulvers auch während der Extraktion erfolgen kann. Bei einer Wasserzugabe von 9–10% des Pulvergewichtes wird das beste Extraktionsergebnis erzielt. Hierbei werden 93% des Gesamtfettes extrahiert. Wie Abb. 2 erkennen läßt, führen höhere Wasseranteile zu verminderten Ausbeuten.

Wir hydratisierten daher den Rückstand der 1. Extraktionsstufe während der 2. Extraktion mit 10% Wasser und konnten damit insgesamt 91,5% des Milchfettes extrahieren (6,5% wurden im Extrakt I, 85% im Extrakt II gefunden).

Mit den Ergebnissen der spektrophotometrischen Untersuchungen, der Beobachtungen bei der Klassentrennung an Magnesiumoxid, der Reaktion mit 3-Methylbenzthiazolon-(2)-hydrazon und des Vergleichs mit Testsubstanzen in zwei dünnschichtchromatographischen Systemen konnten in den Extrakten I (freies Fett) und II (membrangeschütztes Fett) der Vollmilchpulverproben A und B die in der Tabelle zusammengestellten Monocarbonylverbindungen identifiziert werden. In allen vier Fraktionen wurden ferner 3 Verbindungen einer nicht identifizierten Verbindungsklasse (in Abb. 3: II/1–3), 6 Alkanale mit mehr als 12 C-Atomen (III/14–19) und 3 weitere, nicht identifizierte Verbindungen (III/1, IV/10, V/1) aufgefunden. Von diesen zeigt eine Verbindung (IV/10) das Absorptionsspektrum eines Alkanal-2,4-DNPH, eine andere (V/1) das eines Alk-2,4-dienal-2,4-DNPH.

In den Abbildungen 3 und 4 sind die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen am Beispiel der 2,4-DNP-Derivate der neutralen Monocarbonylverbindungen, die aus dem membrangeschützten Fett des Vollmilchpulvers A isoliert wurden, wiedergegeben.

Ein Vergleich der qualitativen Ergebnisse zeigt zunächst, daß das Spektrum der neutralen Monocarbonylverbindungen außerhalb und innerhalb der von einer Membran umgebenen Fettkügelchen sehr ähnlich ist. Dies gilt sowohl für die unter Stickstoff bei 0° C gelagerte Vollmilchpulverprobe A als auch für die an der Luft bei 27° C gelagerte Probe B. In jeder der vier Fraktionen konnte eine lückenlose Reihe der

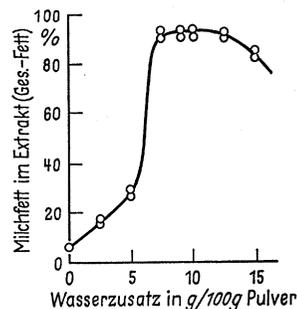


Abb. 2. Extraktion des Milchfettes von sprühgetrocknetem Vollmilchpulver durch Hexan unter Zusatz von Wasser

n-Alkanale von C₂ bis C₁₂, die ungeradzahigen Methylketone C₃ bis C₁₇ sowie Butan-2-on und Hexan-2-on nachgewiesen werden. Jedoch konnten in den Extrakten I im Unterschied zu den Extrakten II nur Spuren der ungesättigten Aldehyde gefunden werden, die den Nachweis einzelner Verbindungen nicht gestatteten.

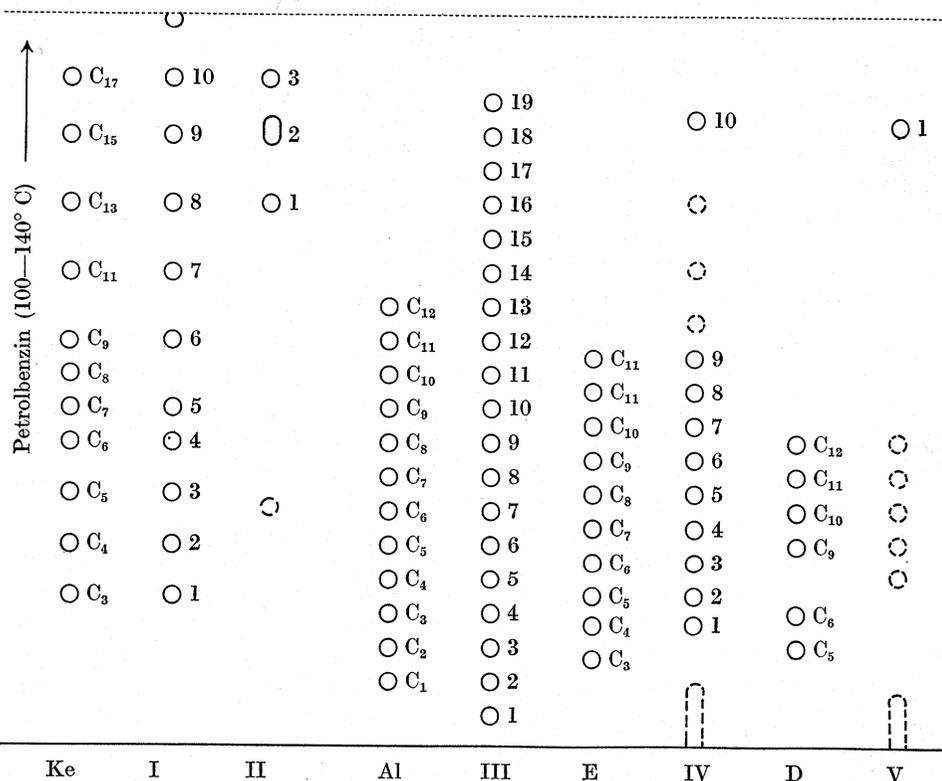


Abb. 3. Dünnschichtchromatographie der 2,4-DNPH im System Kieselgur G + 2-Phenoxyäthanol/Petrolbenzin 100°—140° C (schematische Darstellung). Anm.: Ke, Al, E, D = Testgemische von 2,4-DNPH der Alkan-2-one, n-Alkanale, Alk-2-enale und Alk-2.4-dienale. I—V = Fraktionen zu identifizierender 2,4-DNPH neutraler Monocarbonylverbindungen.

Nur geringe Unterschiede wurden auch bei einem Vergleich der Monocarbonylverbindungspektren der zwei Milchpulver unterschiedlicher Lagerung festgestellt: Sie unterscheiden sich nur in 3 von 43 Positionen. So wurde in den Extrakten I und II der Probe B eine nichtidentifizierte Verbindung vergleichsweise hoher Konzentration gefunden, die in Pulver A nicht enthalten war. Bei der Klassentrennung der 2,4-DNPH erscheint sie unmittelbar vor den Methylketonen, nimmt bei der Dünnschichtchromatographie eine Position zwischen Hexan-2-on und Heptan-2-on (Phenoxyäthanol-System) bzw. zwischen Petan-2-on und Hexan-2-on (Carbowax 400-System) ein und weist eine Wellenlänge maximaler Lichtabsorption von 370 nm auf. Andererseits enthielt Vollmilchpulver A Methanal und geringe Mengen But-2-enal, die in dem bei 27° C gelagerten Pulver nicht nachgewiesen werden konnten.

Während die Herkunft der in der Tabelle aufgeführten Aldehyde auf eine Oxydation der Milchlipide zurückgeführt werden kann, sind die ebenfalls isolierten langkettigen Alkanale mit mehr als 12 C-Atomen hingegen nicht als Autoxydationsprodukte ungesättigter Fettsäuren aufzufassen. Aus der Literatur ist bekannt (17, 18), daß Milchlipoide die langkettigen Aldehyde als Enoläther an Glycerin gebunden enthalten und diese Bindung unter dem Einfluß von Säuren gespalten wird (19). Ihr Auftreten ist somit überwiegend auf die verwendete Isolierungstechnik zurückzuführen.

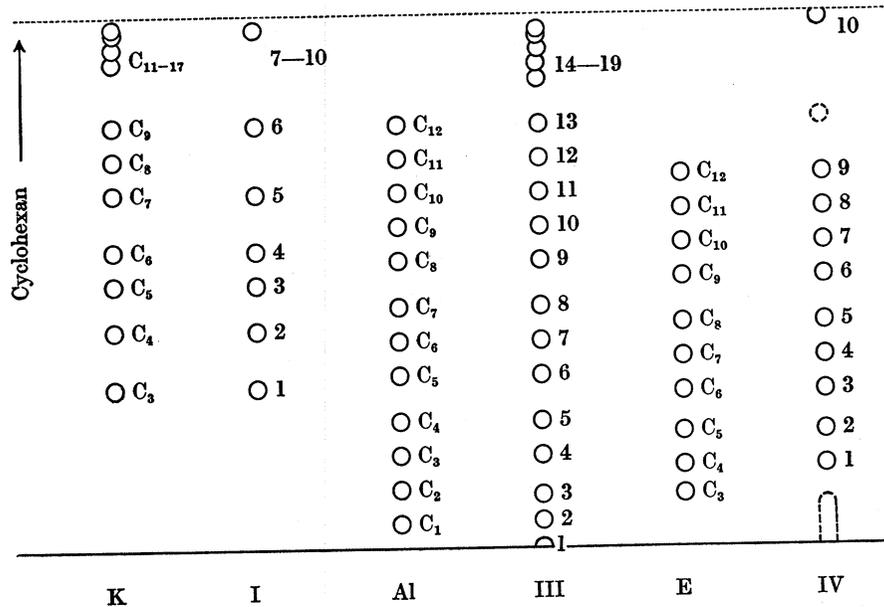


Abb. 4. Dünnschichtchromatographie der 2,4-DNPH im System Kieselgur G + Carbowax 400/Cyclohexan (schematische Darstellung). Vgl. Anm. Abb. 3

Werden die in der Tabelle zusammengestellten quantitativen Ergebnisse der Extrakte I und II verglichen, so fällt zunächst auf, daß nur ein kleiner Anteil der einzelnen Monocarbonylverbindungen im freien Fett vorkommt und der größere Teil in den Fettkügelchen enthalten ist, die von einer Membran umgeben sind. Wenn angenommen wird, daß die an den Veränderungen der Membranproteine beteiligten Carbonylverbindungen bevorzugt aus den von der Membran umschlossenen Fettkügelchen stammen, steht somit der überwiegende Teil der Monocarbonylverbindungen des Vollmilchpulvers als Reaktionspartner zur Verfügung. Setzt man jedoch in Rechnung, daß nur 6,5% des Milchfettes als freies Fett vorlagen, hingegen 85% des Gesamtfettes im Extrakt II enthalten waren, so wird deutlich, daß die Konzentrationen der Carbonylverbindungen in den beiden Fettphasen nicht wesentlich verschieden sind.

Eine vergleichende Betrachtung über den Einfluß der Lagerbedingungen auf den Monocarbonylgehalt der Trockenmilch ermöglichen die Abb. 5 und 6. In Abb. 5 sind die im membrangeschützten Fett der Proben A und B aufgefundenen (identifizierten) n-Alkanale und in Abb. 6 die Alkan-2-one gegenübergestellt. Die verschiedenen Lagerbedingungen hatten nur geringe Unterschiede im Alkanalgehalt

Literatur

1. PARKS, O. W., u. S. PATTON: *J. Dairy Sci.* **44**, 1 (1961).
2. NAWAR, W. W., S. H. LOMBARD, H. E. T. DALL, A. S. GANGULY u. R. McL. WHITNEY: *J. Dairy Sci.* **46**, 671 (1963).
3. SCHORMÜLLER, J., E. GRAMPP u. H.-D. BELITZ: *Diese Z.* **136**, 271 (1968).
4. SCHORMÜLLER, J., E. GRAMPP u. H.-D. BELITZ: *Diese Z.* **137**, 65 (1968).
5. HORNSTEIN, J., u. P. F. CROWE: *Analytic. Chem.* **34**, 1037 (1962).
6. SCHWARTZ, D. P., u. O. W. PARKS: *Analytic. Chem.* **33**, 1396 (1961).
7. WACHS, W.: *Öle und Fette. Teil I.* S. 172. Berlin: Hayn's Erben 1961.
8. Official methods of analysis of the AOAC. Hrsg. von Association Official Agricultural Chemists. 10. Aufl., S. 241. Washington: AOAC 1965.
9. SCHWARTZ, D. P., H. S. HALLER u. M. KEENEY: *Analytic. Chem.* **35**, 2191 (1963).
10. SCHWARTZ, D. P., O. W. PARKS u. M. KEENEY: *Analytic. Chem.* **34**, 669 (1962).
11. URBACH, G.: *J. Chromatogr.* **12**, 196 (1963).
12. BADINGS, H. T., u. J. G. WASSINK: *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* **17**, 132 (1963).
13. SAWICKI, E., T. R. HAUSER u. F. T. FOX: *Analyt. chim. Acta (Amsterdam)* **26**, 229 (1962).
14. CHERONIS, N. D., u. V. M. LEVY: *Microchem. J. (New York)* **1**, 233 (1957).
15. LAMPITT, L. K., u. J. H. BUSHILL: *J. Soc. chem. Industr.* **50**, 45T (1931).
16. KING, N.: *Milchwiss.* **12**, 120 (1957).
17. DUIN, H. VAN: *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* **12**, 90 (1958).
18. SCHOGT, J. C. M., P. H. BEGEMANN u. J. KOSTER: *J. Lipid Res.* **1**, 446 (1960).
19. PARKS, O. W., M. KEENEY u. D. P. SCHWARTZ: *J. Dairy Sci.* **44**, 1940 (1961).
20. PARKS, O. W., M. KEENEY, I. KATZ u. D. P. SCHWARTZ: *J. Lipid Res.* **5**, 232 (1964).